昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，October 2002，45（5）：684 – 687 ISSN 0454-6296

简报 Short Communications

吸血诱导的埃及伊蚊海口株后期胰蛋白酶基因测序及与美国株同源性比较

谢 超，赵彤言*，董言德，陆宝麟
（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100071）

摘要：应用逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）技术从吸血后 24 h 埃及伊蚊海口株总 RNA 中扩增出了后期胰蛋白酶编码区 cDNA 序列。采用自动 DNA 分析仪进行序列分析，并与已知埃及伊蚊美国株后期胰蛋白酶基因及推导的氨基酸序列进行了同源性比较。结果表明：埃及伊蚊海口株后期胰蛋白酶基因序列与美国株同源性达 98%，有 11 个碱基发生变异；氨基酸同源性达 99%，仅有 3 个氨基酸发生变异，但与催化位点密切相关的氨基酸及 N 末端氨基酸序列完全一致。以上结果显示，埃及伊蚊胰蛋白酶不同地理株间存在微小的差异。

关键词：埃及伊蚊（海口株）；胰蛋白酶；逆转录-聚合酶链式反应
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）05-0684-04

Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from *Aedes aegypti* Haikou strain

XIE Chao，ZHAO Tong-Yan*，DONG Yan-De，LU Bao-Lin（Institute of Microbiology and Epidemiology，Academy of Military Medical Sciences，Beijing 100071，China）

Abstract: This paper reports a cDNA sequence and its deduced amino acid sequence in the late trypsin of *Aedes aegypti* Haikou strain. The cDNA fragment from the whole body of adult *Aedes aegypti* in 24 h after blood ingesting was amplified by RT-PCR and its specificity was confirmed by electrophoresis. The cDNA was inserted into pGEM T easy vector and transformed into *E. coli* JM109. The positive clone was sequenced by an automatic DNA sequencer. The cDNA and the deduced amino acid sequence were highly homologous with the late trypsin from the *Aedes aegypti* American strain，showing 98% and 99% similarity，respectively. The deduced amino acid sequence is highly homologous with those of other mosquitos' trypsins in both residues around the catalytic pocket and N-terminal sequences.

Key words: *Aedes aegypti*（Haikou strain）；trypsin；RT-PCR

蚊虫胰蛋白酶是由中肠上皮细胞产生并分泌于肠腔的一种重要的丝氨酸蛋白酶。在蚊虫消化吸取的血液、获取营养以完成生殖营养周环的过程中起重要作用。近年来对蚊虫胰蛋白酶的生理生化、合成与酶原激活等均有详细报道（Graf and Briegal，1985；Borovosky and Schlein，1988；Graf *et al*.，1989，1991），对黄热病毒和登革病毒主要传播媒介埃及伊蚊胰蛋白酶基因表达与调控的研究日渐深入（Barillas-Mury *et al*.，1993，1995；Kalhok *et al*.，1993），但国内尚未开展相关研究。为此，作者借助于分子生物学手段，首先克隆了埃及伊蚊海口株后期胰蛋白酶基因编码区 cDNA 全序列，并与其同源基因序列进行了比较，为进一步利用 DNA 重组或蛋白表达等技术获得大量胰蛋白酶创造了条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent 购自 Gibco 公司，RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司，Deep Vent

基金项目：总后“九五”医学杰出中青年基金课题
第一作者简介：谢超，女，1970 年 11 月生，博士，助研，从事干细胞方面的研究，E-mail：yuner5426@sina.com.cn
* 通讯作者 Author for correspondence
收稿日期 Received：2000-07-20；接受日期 Accepted：2001-08-31

DNA 聚合酶购自 Biolab 公司，pGEM T easy 载体系统购自 Promega 公司。

1.2　蚊虫饲养

埃及伊蚊海口株，3～6 日龄，本所养蚊室繁殖。在 25±1℃、相对湿度 80%±5%、光照 14 h/天的养蚊室饲养。饥饿 18～24 h 后，吸食昆明系小白鼠血，饱血后 24 h 收集蚊虫用于总 RNA 提取。

1.3　引物设计

根据 Barillas-Mury 等（1991）报道的埃及伊蚊美国株后期胰蛋白酶 cDNA 序列，利用 GOLDKEY 软件设计 2 条特异引物，在 Takara 公司合成。

P1：上游引物 5′AAATGTTCACTTCAACGGTGG 3′；

P2：下游引物 5′TCATTACCCTGCTCACAGTCC 3′。

1.4　埃及伊蚊总 RNA 提取

采用 Gibco 公司 TRIzol Reagent 总 RNA 提取试剂提取总 RNA。每组取 10 只蚊虫，加入 1 mL TRIzol 试剂，迅速研磨，而后室温静置 5 min；加 0.2 mL 氯仿剧烈振荡 15 s，12 000×g 离心 15 min；小心吸取上层水相，用异丙醇沉淀，70% 乙醇洗 1 次、抽干。提取的 RNA 溶解于适量 DEPC 处理的无菌水中，测定 OD_{260} 与 OD_{280} 值，判断 RNA 的质量和纯度，－70℃储存备用。

1.5　埃及伊蚊后期胰蛋白酶 cDNA 第一链合成

利用 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链。反应体系 20 μL，含 10×RNA PCR 缓冲液 2 μL，2.5 mmol/L dNTPs 2 μL，逆转录酶 1 μL（1 U/μL），RNA 酶抑制剂 1 μL，20 pmol/L Oligo（dT）引物，总 RNA 约 1 μg，$MgCl_2$ 浓度为 5 mmol/L。按以下条件进行反转录反应：42℃，60 min；99℃，5 min；5℃，5 min。

1.6　PCR 扩增

PCR 反应采用两种方式：第一种利用 Takara 公司 RNA PCR 试剂盒，体系 50 μL，取上述反转录产物 10 μL，直接加入 25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μL，10×PCR 缓冲液 5 μL，Takara Taq 酶 0.5 U，上游引物及下游引物各 20 pmol。第二种方法基本同上，采用 Biolab 公司的 Deep Vent 酶，该酶有 3′→5′校读功能，有很高的保真性。PCR 反应条件如下：94℃预变性 3 min；94℃ 1 min；60℃ 1 min；72℃ 1 min，循环 30 次，72℃延伸 8 min。PCR 反应结束后，1.2% 琼脂糖电泳鉴定结果。

1.7　PCR 产物的克隆和序列测定

PCR 产物连接入 pGEM T Easy 载体，转化感受态大肠杆菌 JM109 后，将菌铺在预先涂有 X-gal 和 IPTG 的氨卞青霉素琼脂平板上，37℃培养过夜，挑取白色克隆扩大培养提取质粒。利用 *Eco*RⅠ单酶切及 *Eco*RⅠ＋*Pst*Ⅰ双酶切，鉴定阳性重组子，鉴定正确的克隆利用 ABI377XL DNA 自动测序仪进行序列测定。

1.8　序列同源性分析

利用 NCBI 提供的同源性比较软件 BLAST 2.0 进行同源性比较分析，对由该基因推导出的氨基酸序列也进行分析。

2　结果

2.1　埃及伊蚊后期胰蛋白酶 cDNA 及同源性比较

根据 Barillas-Mury 等（1991）报道的埃及伊蚊美国株后期胰蛋白酶基因序列，设计了两条特异性引物，以吸血后 24 h 埃及伊蚊海口株总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链，用两种 PCR 方式均扩增出长度 800 bp 左右的片段，与预期扩增片段大小一致。该片段连接入 pGEM T Easy 载体，经 *Eco*RⅠ单酶切及 *Eco*RⅠ＋*Pst*Ⅰ双酶切鉴定，扩增基因存在 *Pst*Ⅰ位点，但不存在 *Eco*RⅠ位点。将克隆到 pGEM T Easy 载体中的基因片段进行序列测定，结果表明该基因全长 788 bp，与报道的埃及伊蚊美国株后期胰蛋白酶基因同源性达 98%，有 11 个碱基发生变异，其中包括单一 *Eco*RⅠ位点的一个碱基突变，使这一位点不复存在，这也印证了酶切鉴定的结果。图 1 为埃及伊蚊海口株与美国株后期胰蛋白酶编码区 cDNA 核苷酸序列的比较。

2.2　埃及伊蚊后期胰蛋白酶基因编码氨基酸序列分析及同源性比较

分析表明，该基因含 773 bp 的开放阅读框，可编码 257 个氨基酸（3～773 bp），其中包括 15 个氨基酸的信号肽（3～47 bp）、10 个氨基酸的激活肽（48～77 bp）。整个编码序列与 Barillas-Mury 等（1991）报道的埃及伊蚊美国株胰蛋白酶氨基酸同源性达 99%，仅有 3 个位点的氨基酸发生变异（图 1）。

3　讨论

埃及伊蚊吸食动物的血液后，中肠内的胰蛋白酶分泌旺盛，它由中肠上皮细胞产生并分泌于肠腔，吸血前不存在，吸血后则被诱导以为“早期”和“后期”形式合成并分泌（Felix *et al.*，1991；

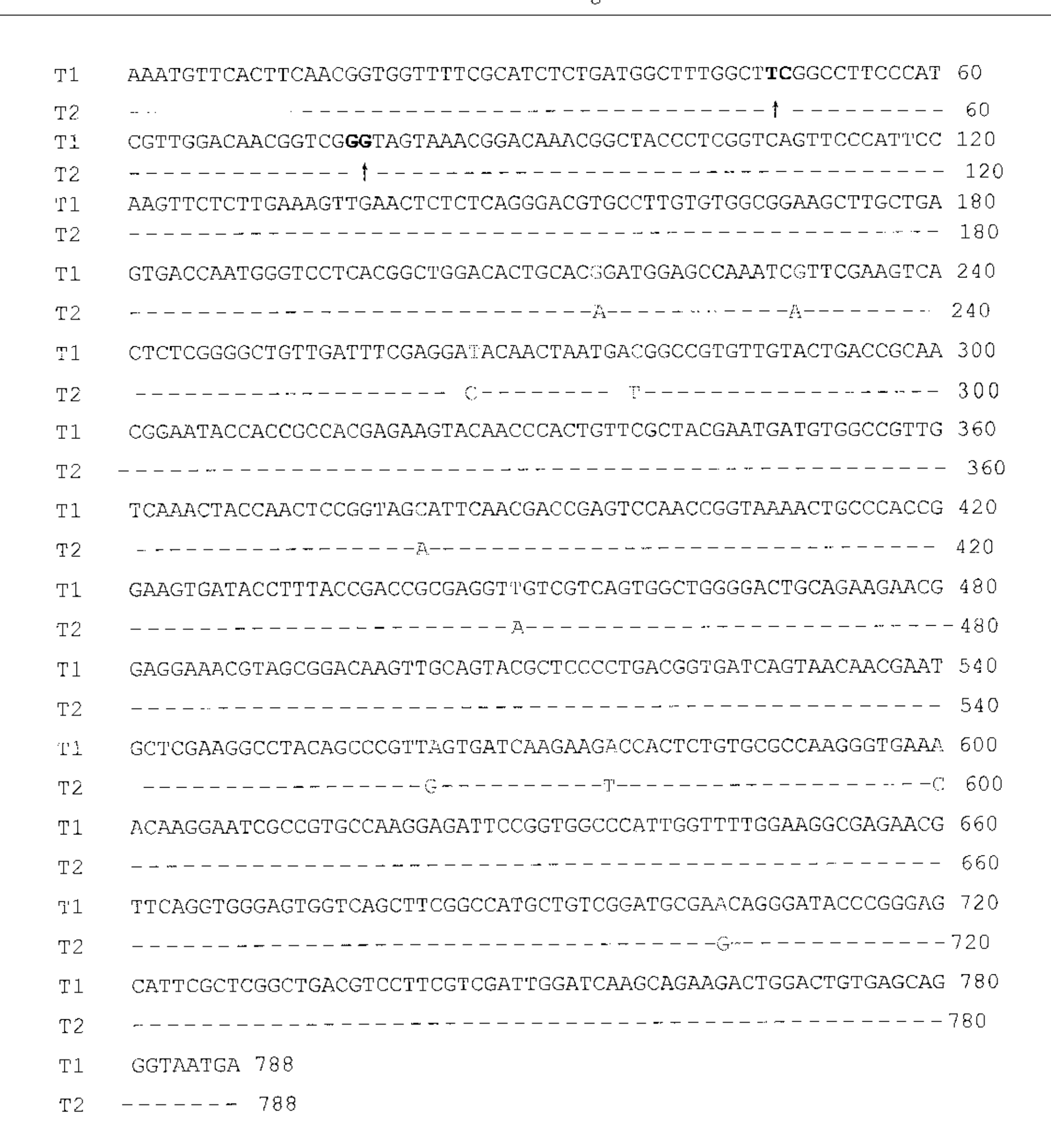


图1 埃及伊蚊海口株（T1）后期胰蛋白酶编码区cDNA核苷酸及氨基酸序列与美国株（T2）的比较

Fig. 1 Comparison of nucleotide sequences and amino acids in the late trypsin cDNA of *Ae. aegypti* Haikou strain (T1) and American strain (T2)

"-"表示核苷酸及氨基酸序列相同；"T↑C"推导的信号肽裂解位点；"G↑G"激活肽裂解位点（埃及伊蚊海口株后期胰蛋白酶cDNA序列GenBank登录号为：AF187078）

"-" same nucleotide; "T↑C" indicates the predicted site of signal cleavage; "G↑G" indicates site of the putative activation peptide (GenBank accession number of the late trypsin cDNA of *Ae. aegypti* Haikou strain: AF187078)

Graf *et al*., 1991)。通过对胰蛋白酶基因的克隆与序列测定，作者获得了埃及伊蚊海口株后期胰蛋白酶基因编码区cDNA全序列，与Barillas-Mury等（1991）报道的埃及伊蚊美国株后期胰蛋白酶基因同源性达98%。已报道的序列存在单一*Eco*RⅠ位点，作者扩增的胰蛋白酶基因则没有*Eco*RⅠ位点。氨基酸序列比较结果表明二者有3个氨基酸的差异，但二者N末端氨基酸序列（如激活肽、活化肽）与Graf等（1991）报道的蚊虫胰蛋白酶N末端序列相同，胰蛋白酶催化位点His-45，Asp-100，Ser-203亦高度保守，还具由3对半胱氨酸组成的二硫键结构，对保证胰酶肽链的正确折叠非常重要，这表明已经克隆出埃及伊蚊海口株后期胰蛋白酶基因全序列。以上结果亦表明，埃及伊蚊相同蚊种不同地理株之间的胰蛋白酶基因存在着很小的变异。

参 考 文 献 (References)

Barillas-Mury C, Wells M A, 1993. Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and

characterization of the upstream regulatory region. *Insect Mol. Biol.*, 2: 7－12.

Barillas-Mury C, Graf R, Hagedorn H H, Wells M A, 1991. cDNA and deduced amino acid of a blood meal-induced trypsin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem.*, 21: 825－831.

Barillas-Mury C, Noriega F G, Wells M A, 1995. Early trypsin axtivity is part of the signal transduction system that activites transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 25 (2): 241－246.

Borovosky D, Schlein Y. 1988. Quantitative and determination of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 8: 249－260.

Felix C R, Betschart B, Billingsley P F, Freyvogel T A, 1991. Post-feeding induction of trypsin in the midguts of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is separable into two phases. *Insect. Biochem.*, 21: 197－203.

Graf R, Briegel H, 1985. Isolation of trypsin isoenzymes from the mosquito *Aedes aegypti* (L.). *Insect. Biochem.*, 19: 129－137.

Graf R, Boehlen P, Briegal H, 1989. The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) and *in vitro* stimulation in isolated midguts. *Insect Biochem.*, 19: 129－137.

Graf R, Boehlen P, Briegal H, 1991. Structural diversity of trypsin from different mosquito species feeding on vertebrate blood. *Experimenta*, 47: 603－609.

Kalhok S E, Tabak L M, Prosser D E, Brook W, Downe A E, White B N, 1993. Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 2: 71－79.